第39卷 第1期
1996年2月

昆虫学报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.39, No.1
Feb., 1996

棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定*

王琛柱　　钦俊德

（中国科学院动物研究所　北京　100080）

摘要　根据棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)中肠酶液对蛋白酶专性底物在不同pH下的水解作用，棉铃虫中肠的3种丝氨酸蛋白酶得到鉴定。它们是：强碱性类胰蛋白酶，水解α-N-苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基苯胺的最适pH在10.50以上；弱碱性类胰蛋白酶，水解p-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯的最适pH为8.50～9.00；类胰凝乳蛋白酶，水解N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯的最适pH亦为8.50～9.00。中肠总蛋白酶活性用偶氮酪蛋白测定，最适pH亦在10.50以上。Ca^{2+}对昆虫蛋白酶无影响，Mg^{2+}仅对弱碱性类胰蛋白酶有激活作用。对苯甲基磺酰氟和甲基磺酰-L-赖氨酸氯甲基酮对弱碱性类胰蛋白酶的抑制作用较强，而对强碱性类胰蛋白酶的抑制作用较弱。甲基磺酰-L-苯丙氨酸氯甲基酮除能抑制类胰凝乳蛋白酶外，还能激活弱碱性类胰蛋白酶。对牛胰蛋白酶有强抑制作用的卵粘蛋白抑制剂对昆虫蛋白酶却无抑制作用。大豆胰蛋白酶抑制剂对该虫的3种丝氨酸蛋白酶均有强的抑制作用。

关键词　棉铃虫，蛋白酶，激活剂，抑制剂

近年来，植物蛋白酶抑制剂在害虫防治上显示出一定的应用潜力[1~3]，尤其是蛋白酶抑制剂抗虫基因工程取得较大的进展。Hilder等将豇豆胰蛋白酶抑制剂基因成功地转入烟草，转基因植株表达的蛋白酶抑制剂显著地抑制烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 的为害[4]。棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)是我国黄河流域棉区常年发生的害虫，主要为害棉花、小麦、玉米、花生、大豆等作物。这些寄主植物体内多含有蛋白酶抑制剂。是否能利用植物蛋白酶抑制剂增强作物抗性以减轻棉铃虫的为害？要解决这一问题，首先应研究棉铃虫肠道内蛋白酶性质及其与抑制剂相互作用机理的过程，找出利用这种新型防治措施的生化机理，进而确定它在害虫防治应用中的可能性。

蛋白酶活力通常利用天然底物和合成底物进行测定。各种蛋白酶均可水解天然底物酪蛋白，因此由酪蛋白测得的活力是蛋白酶的总活力，而要测定某些蛋白酶的活力均须借助专一的合成底物。在鳞翅目害虫肠道内，属丝氨酸蛋白酶类的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶是主要的蛋白酶。为适应肠道的碱性环境，这类酶反应的最适pH均较高，但不同昆虫间有差异[5]。α-N-苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基苯胺(BAPNA)和p-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME)是胰蛋白酶的专性底物，N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯(BTEE)是胰凝乳蛋白酶的专性底物。本研究利用这些天然底物和合成底物

* 国家自然科学基金资助项目

1994-04-23收稿，1995-02-22收修改稿

鉴定了棉铃虫中肠内蛋白酶的部分性质，并以脊椎动物同类酶作比较研究了在最适 pH 下蛋白酶激活剂和抑制剂对棉铃虫中肠蛋白酶活力的影响。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 试虫 棉铃虫为室内人工饲养的标准试虫，虫源由北京农业大学植保系抗虫性研究室提供。养虫和试验条件为温度27 ℃、相对湿度 75%，光照时间 14h。成虫饲以 10% 的蜂蜜水溶液。卵产于纱布上。幼虫饲于直径 2 cm、长 10 cm 的平底指形管内，每管 1 头。幼虫人工饲料主要参照 Bot 的配方配制[6]，原麦胚粉和酪蛋白分别由麦芽粉和奶粉代替。

1.1.2 试剂 牛胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶、氨苯磺胺偶氮酪蛋白、α－N－苯甲酰－DL－精氨酸－p－硝基苯胺（BAPNA）、p－甲苯磺酰－L－精氨酸甲酯(TAME)、N－苯甲酰－L－酪氨酸乙酯(BTEE)、甲基磺酰－L－赖氨酸氯甲基酮(TLCK)、甲基磺酰－L－苯丙氨酸氯甲基酮(TPCK)、大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)、卵粘蛋白抑制剂(OI)均由美国 Sigma 提供；二硫代苏糖醇(DTT)由英国 BDH 生产；对苯甲基磺酰氟(PMSF)由德国 E. Merck 生产；其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 中肠酶液的制备 棉铃虫5 龄幼虫在 0 ～ 4 ℃ 下迅速解剖，用预冷的 0.15mol/L NaCl 溶液冲去体液，截取中肠及其内含物，冰冻贮存(－15 ℃)。测试前，取出稍融后，以 0.15mol/L NaCl 溶液在冰浴内匀浆。匀浆液用 Beckman－11 离心机在 11 200×g、4 ℃ 条件下离心 15min，取上清液作为测试用的中肠酶液。

1.2.2 蛋白酶活性测定 活性测定参照Houseman 等和 Campbell 等的方法[7～9]。蛋白酶活性均在 30 ℃ pH6.00 ～ 10.50 下，使用 UV－754 型紫外－可见分光光度计(上海第三分析仪器厂)测定，设 3 次重复。

总蛋白酶活性用氨苯磺胺偶氮酪蛋白为底物测定。偶氮酪蛋白以 20 mg/mL 的浓度溶于 0.15 mol/L NaCl 溶液。取该液 0.3 mL 加入含中肠酶液的 0.3 mL 0.2 mol/L 反应缓冲液中反应。在 30 ℃ 反应 2h，加入 0.6 mL 的 20%(重量/体积)三氯乙酸终止反应。反应混合物在 11 200×g、4 ℃ 下离心 15 min 后，取上清液，在 366 nm 测光吸收值。反应混合物 1 个吸收单位的变化定义为 1 个偶氮酪蛋白单位。

类胰蛋白酶活力测定采用两种专性底物：BAPNA 和 TAME。BAPNA 以 20 mg/mL 溶于二甲基亚砜，取 40μl 加入含中肠酶液的 1.5 mL 0.1 mol/L 反应缓冲液中，反应 20 min 后，加入 0.5 mL 30%(体积/体积)乙酸终止反应，在 405 nm 测光吸收值。TAME 以2 mmol/L 溶于 0.15 mol/L NaCl 溶液中。反应从始至终在 247 nm 测定光吸收值。

类凝乳蛋白酶活力测定以 BTEE 为反应底物。BTEE 以 1 mmol/L 溶于含 10%(体积/体积)甲醇的 0.15 mol/L NaCl 溶液中，取该液 0.5 mL加入 0.5 mL含中肠液的 0.2 mol/L 反应缓冲液。反应从始至终在 256 nm 测光吸收值。

反应缓冲体系为磷酸二氢钾－氢氧化钠缓冲液，pH6.00 ～ 8.00；Tris－盐酸缓冲液，pH7.00 ～ 9.00；硼砂－氢氧化钠缓冲液，pH8.50 ～ 9.50；甘氨酸－氢氧化钠缓冲液，pH 8.50 ～ 10.50。BAPNA、TAME 和 BTEE 的克分子消光值分别为8800，

540和964，用以计算相应水解底物的摩尔数。

1.2.3　激活剂和抑制剂对蛋白酶活力的影响　激活剂和抑制剂对蛋白酶的作用均在酶反应的最适条件下测定。昆虫酶液对BAPNA的水解用pH10.50的甘氨酸缓冲液，对TAME和BTEE的水解均用pH8.50的Tris缓冲液。两种脊椎动物酶，牛胰蛋白酶Ⅲ型和牛胰凝乳蛋白酶Ⅱ－S型活力测定用含5 mmol/L $CaCl_2$、pH8.0的Tris缓冲液。激活剂或抑制剂与昆虫中肠酶液或脊椎动物酶液在缓冲液中混匀，30 ℃水浴内放置15min，然后加入相应的反应底物，用前述方法测定各种酶的活性，并设置不含激活剂或抑制剂的对照，重复3次。为使昆虫蛋白酶与脊椎动物蛋白酶的测定具有可比性，调整反应体系中脊椎动物蛋白酶的含量，使二者在相同的时间内可水解等量的底物。

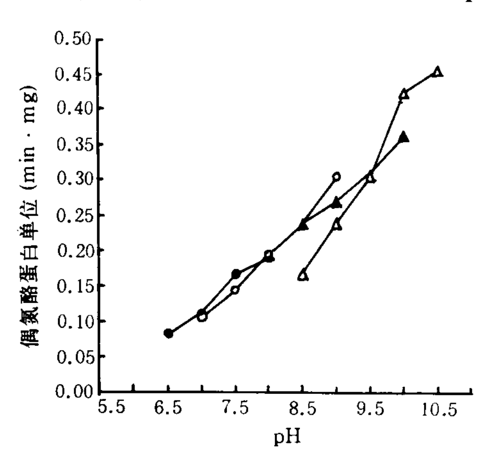
激活剂和抑制剂及其在反应混合物内的浓度分别为：$MgCl_2$、$CaCl_2$、EDTA（乙二氨四乙酸）和EGTA（乙烯二醇双氨乙基醚四乙酸），浓度均为1mmol/L和3mmol/L；IAA（碘乙酰胺），0.5 mmol/L和1mmol/L；DTT，1.0 mmol/L和2.5mmol/L；PMSF（先溶于正丙醇），2.5 mmol/L和5mmol/L；TLCK（先溶于甲醇），0.25mmol/L和0.50 mmol/L；TPCK（先溶于甲醇），10 μmol/L和20 μmol/L；大豆胰蛋白酶抑制剂和卵粘蛋白抑制剂，1ml反应混合液中含5 μg和10 μg。

1.2.4　蛋白质含量测定　以牛血清蛋白为标准蛋白，用Bradford的方法测定[10]。

2　结果与分析

2.1　蛋白酶活性的鉴定

总蛋白酶活性用蛋白酶的通用底物偶氮酪蛋白测定。结果表明，当pH由6.00向10.50提高时，总蛋白酶活力随之增加，在pH为10.50，总蛋白酶比活力在测试范围内达最高(图1)。类胰蛋白酶活性在不同pH下用BAPNA测定的结果，与总蛋白酶活



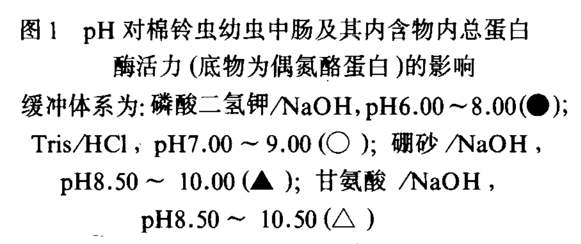


图1　pH对棉铃虫幼虫中肠及其内含物内总蛋白酶活力（底物为偶氮酪蛋白）的影响

缓冲体系为：磷酸二氢钾/NaOH，pH6.00～8.00(●)；Tris/HCl，pH7.00～9.00(○)；硼砂/NaOH，pH8.50～10.00(▲)；甘氨酸/NaOH，pH8.50～10.50(△)

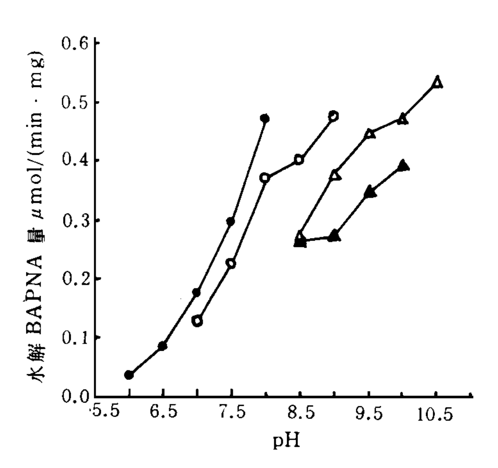


图2　pH对棉铃虫幼虫中肠及其内含物内水解BAPNA的类胰蛋白酶活力的影响

缓冲体系为：磷酸二氢钾/NaOH，pH6.00～8.00(●)；Tris/HCl，pH7.00～9.00(○)；硼砂/NaOH，pH8.50～10.00(▲)；甘氨酸/NaOH，pH8.50～10.50(△)

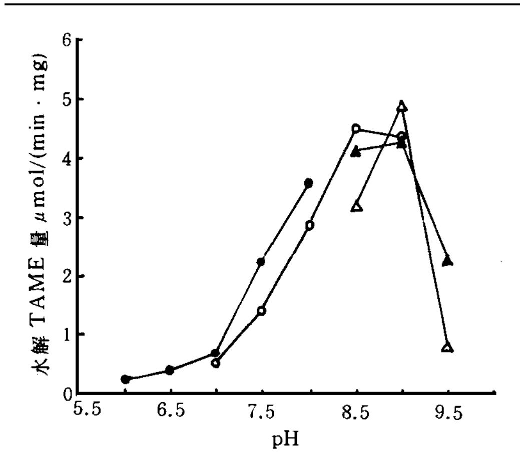


图 3　pH 对棉铃虫幼虫中肠及其内含物内水解 TAME 类胰蛋白酶活力的影响

缓冲体系为：磷酸二氢钾 /NaOH，pH6.00 ～ 8.00(●)；Tris/HCl，pH7.00 ～ 9.00 (○)；硼砂 /NaOH，pH8.50 ～ 9.50 (▲)；甘氨酸 /NaOH，pH8.50 ～ 9.50 (△)

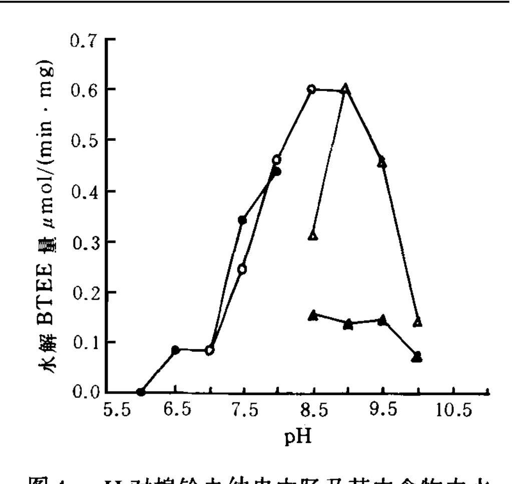


图 4　pH 对棉铃虫幼虫中肠及其内含物内水解 BTEE 的类胰凝乳蛋白酶活力的影响

缓冲体系为：磷酸二氢钾 /NaOH，pH6.00 ～ 8.00(●)；Tris/HCl，pH7.00 ～ 9.00 (○)；硼砂 /NaOH，pH8.50 ～ 10.00 (▲)；甘氨酸 /NaOH，pH8.50 ～ 10.00 (△)

性的变化很相似，也随着 pH 的提高而增大，在 pH 为 10.50，比活力达最高，因而称之为强碱性类胰蛋白酶 (图 2)。类胰蛋白酶活性在不同 pH 下用 TAME 测定结果显示，在 Tris 缓冲液中酶的最适 pH 为 8.50，在硼砂和甘氨酸缓冲液中，最适 pH 为 9.00，称之为弱碱性类胰蛋白酶 (图 3)。类胰凝乳蛋白酶活力用 BTEE 测定的结果见图 4，在 Tris 和硼砂缓冲液中，最适 pH 均为 8.50；在甘氨酸缓冲液中，最适 pH 为 9.00。

2.2　Ca^{2+}、Mg^{2+}、EDTA 和 EGTA 对蛋白酶活力的影响

二价金属离子 Ca^{2+}、Mg^{2+} 和金属螯合剂为多种蛋白酶的激活剂。表 1 列出了它们

表 1　激活剂对棉铃虫中肠及其内含物内类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶活力的影响

激活剂	浓度 (mmol/L)	类胰蛋白酶 TAME	类胰蛋白酶 BAPNA	类胰凝乳蛋白酶 BTEE
Ca^{2+}	1	100.78±1.35	89.92±6.59	101.52±2.63
	3	106.97±9.13	98.50±14.87	90.03±10.44
Mg^{2+}	1	112.56±3.02*	107.91±6.56	83.71±9.66
	3	117.30±5.41*	100.25±8.43	88.38±6.31
EDTA	1	84.33±7.93*	93.92±2.16	63.26±9.11*
	3	58.76±1.50*	100.97±4.72	63.26±0.66*
EGTA	1	97.80±4.60	105.07±3.95	64.65±9.26*
	3	97.14±5.56	108.64±2.71	58.97±12.10*

注：数据为相对活力百分数及其标准差，100% 活力为仅有酶与底物在缓冲液中反应测得的活力 (对照)，数值大于 100 表示对酶有激活作用，小于 100 表示有抑制作用。 * t 测验差异显著 ($P<0.01$)

对昆虫丝氨酸蛋白酶活力的影响。对弱碱性类胰蛋白酶，仅 Mg^{2+} 有一定的激活作用，EDTA 反而有一定的抑制作用；对强碱性类胰蛋白酶，均没有显著的激活或抑制作用。对类胰凝乳蛋白酶，二价离子没有激活作用，EGTA 和 EDTA 有抑制作用。

2.3　抑制剂对蛋白酶活力的影响

表 2 列出了各种抑制剂在两种不同的浓度下对昆虫和脊椎动物专性蛋白酶的抑制效果。TLCK 对昆虫弱碱性和强碱性类胰蛋白酶的抑制作用很强，TPCK 不仅是胰凝乳蛋白酶的专性抑制剂，而且是昆虫弱碱性类胰蛋白酶的激活剂。大豆胰蛋白酶抑制剂对昆虫弱碱性和强碱性类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶均有较强的抑制作用。比较昆虫酶与高等脊椎动物酶对抑制剂的反应，二者有共性，但也有较大的差异。最明显的不同如卵粘蛋白抑制剂对脊椎动物的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶均有很强的抑制作用，但对昆虫的类似酶几乎没有影响。

表 2　抑制剂对棉铃虫中肠类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶以及脊椎动物 (牛)类似酶活力的影响

抑制剂	浓度	(类)胰蛋白酶 TAME		(类)胰蛋白酶 BAPNA		(类) 胰凝乳蛋白酶 BTEE	
		棉铃虫	脊椎动物(牛)	棉铃虫	脊椎动物(牛)	棉铃虫	脊椎动物 (牛)
IAA	0.5 mmol/L	86.66±4.24	83.25±7.16	95.59±9.17	111.18±16.36	89.47±5.27	56.16±4.48
	1.0 mmol/L	85.26±3.37	83.14±5.31	99.96±2.42	116.13±13.98	86.62±14.07	44.29±5.15
DTT	1.0 mmol/L	79.62±3.68	65.08±4.96	86.36±11.29	93.29±6.96	78.69±7.75	59.24±4.32
	2.5 mmol/L	53.03±2.02	60.25±3.54	73.88±7.83	81.64±7.54	83.62±11.67	50.15±4.78
PMSF	2.5 mmol/L	50.45±4.32	0	104.84±10.29	1 8.00± 6.22	0	0
	5.0 mmol/L	35.44±2.57	0	85.70±10.67	4.85±3.02	0	0
TLCK	0.25 mmol/L	0	5.45±1.19	68.46±11.17	25.83±2.75	86.63±9.70	32.75±4.87
	0.5 mmol/L	0	3.11±1.25	74.21±5.50	19.54±2.83	88.00±10.58	45.95±7.25
TPCK	10μmol/L	134.24±9.17	95.48±6.17	93.93±2.65	85.08±11.58	77.27±3.94	36.22±4.13
	20μmol/L	141.23±11.34	85.18±4.28	88.54±4.85	80.18±13.33	78.94±7.90	29.68±9.11
STI	5 μg/mL	7.96±1.95	0	4.50±0.71	0.33±0.31	37.04±8.48	7.94±7.28
	10 μg/mL	7.21±1.72	0	2.19±0.28	0	22.22±11.11	6.35±2.75
OI	5μg/ mL	101.59±2.75	0	97.57±3.73	12.77±3.59	89.39±11.44	57.14±12.60
	10 μg/mL	102.96±1.56	0	91.92±5.77	1.56±0.76	95.45±4.55	58.73±5.50

注：数据为相对活力百分数及其标准差，100% 活力为仅有酶与底物在缓冲液中反应测得活力 (对照)，数值小于 100 表示有抑制作用。为使棉铃虫和脊椎动物酶活力测定结果具有可比性，控制酶在对照条件相同的时间内可水解相等的底物量

3　讨论

Xu 和 Qin 曾对棉铃虫中肠粗提酶液进行柱层析分离，所得组分具有丝氨酸蛋白酶活性，但未用专性底物进行鉴定[11]。本研究根据中肠酶液对 3 种专性的合成底物的水解反应的最适 pH，初步鉴定了棉铃虫幼虫中肠的 3 种丝氨酸蛋白酶，包括：弱碱性类胰

蛋白酶、强碱性类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶。这些酶为适应棉铃虫中肠的碱性环境，其最适 pH 均为碱性，并高于脊椎动物相应蛋白酶的最适 pH。

昆虫肠道中可能有多种类胰蛋白酶，这在某些鳞翅目昆虫中已得到证明。Ahmad 在海灰翅夜蛾 *Spodoptera litura* 中分离到 3 种类胰蛋白酶，其最适 pH 分别为 11.0，10.5 和 9.0[12]。它们均可分解 BAPNA 和 BAEE（α－N－苯甲酰－L－精氨酸乙酯），并受 PMSF 和 TLCK 的抑制，遗憾的是它们对抑制剂的反应没有在最适条件下测试。本研究在测定抑制剂对昆虫和脊椎动物蛋白酶的作用时，均在各种酶的最适条件下进行。棉铃虫中肠内弱碱性和强碱性胰蛋白酶有一定的共性，均可为大豆胰蛋白酶抑制剂所抑制，但在对 IAA、DTT、PMSF 以及胰蛋白酶的专性抑制剂 TLCK 的反应上有一定的差异。弱碱性类胰蛋白酶的性质与牛胰蛋白酶的性质较为接近。强碱性胰蛋白酶在不同 pH 下活性的变化与肠道总蛋白酶活性的变化十分相似，说明这种酶可能是棉铃虫幼虫消化道内的一种重要消化酶。

有关鳞翅目昆虫的类胰凝乳蛋白酶的报道很少。Broadway 和 Duffey 在对谷实夜蛾 *Heliothis zea* 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的研究中，发现二种昆虫的中肠液内均有水解BTEE 酶的活性，但由于活性太低以致于未能进一步研究[13]。Pritchett 等根据 TPCK 对酪蛋白和 BTEE 水解作用的影响鉴定出类胰凝乳蛋白酶在粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 的肠道内存在[14]。本研究证实了类胰凝乳蛋白酶在棉铃虫中肠内的存在，并发现该酶具有与弱碱性类胰蛋白酶一致的最适 pH。

脊椎动物蛋白酶在蛋白酶抑制剂作为植物防御因子的研究中起着重要作用。由于昆虫蛋白酶在生化特性上与相应的脊椎动物蛋白酶类似，而且后者的标准制剂易于获得，在抗虫蛋白酶抑制剂筛选鉴定中常常选用脊椎动物蛋白酶进行体外测定。本研究结果表明，昆虫蛋白酶与类似的脊椎动物蛋白酶有共性，但也有较大差异。Ca^{2+} 对脊椎动物胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶均有激活作用[15]，而对棉铃虫的类似酶没有这种作用，但 Mg^{2+} 对该虫的弱碱性胰蛋白酶有一定的激活作用。对脊椎动物蛋白酶有效的抑制剂对昆虫蛋白酶并不一定有效，卵粘蛋白酶的作用就是一个最好的证明。因此，在蛋白酶抑制剂作为抗虫因子的筛选鉴定中，应以其与昆虫蛋白酶的作用作为依据。大豆胰蛋白酶抑制剂不仅对棉铃虫类胰蛋白酶有很强的抑制作用，而且对棉铃虫类胰凝乳蛋白酶也有效，因此，它可能在棉铃虫防治中有重要的利用价值。

致谢　张书芳副研究员提供部分实验条件，项秀芬高级实验师饲养试虫，谨致谢意。

参　考　文　献

1　Green T R, Ryan C A. Wound－induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. Science 1972, **175**: 776～777

2　Gatehouse A M R, Gatehouse J A *et al*. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. J. Sci. Food. Agric. 1979, **30**: 948～958

3　Broadway R M, Duffey S S *et al*. Plant proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? Entomol. Exp. Appl. 1986, **41**: 33～38

4 Hilder V A, Gatehouse A M R *et al*. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco Nature 1987, **300**: 160 ~ 163

5 Applebaum S W. Biochemistry of digestion. In: Kerkut G A, Gilbert L I (eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 4. Oxford: Pergamon Press, 1985, 279 ~ 311

6 Bot J. Rearing *Heliothis armigera* Hubn. and *Prodenia litura* F. on an artificial diet. S. Afr. J. Agri. Sci. 1966, **9**: 538 ~ 539

7 Housman J G, Campbell F C *et al*. A preliminary characterization of digestive proteases in the posterior midgut of the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). Insect Biochem. 1987, **17**:213 ~ 218

8 Housman J G, Philogene B J R *et al*. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). Can. J. Zool. 1989, **67**: 864 ~ 868

9 Campbell F C, Housman J G *et al*. A preliminary characterization of alkaline digestive proteases in the posterior midgut of face fly *Musca autumnalis* De Greer. Can. J. Zool. 1987, **65**: 635 ~ 639

10 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 1976, **72**: 248 ~ 254

11 Xu G, Qin J D. Extraction and characterization of midgut protease from *Heliothis armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their inhibition by tannic acid. J. Econ. Entomol. 1994, **87**(2): 334 ~ 338

12 Ahmad Z, Saleemuddin M *et al*. Purification and characterisation of three alkaline proteases from the gut of the larva of armyworm, *Spodoptera litura*. Insect Biochem. 1980, **10**: 667 ~ 673

13 Broadway R M, Duffey S S. Plant proteinase inhibitors: Mechanisms of action and effect on the growth and physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. J. Insect Physiol. 1986, **32**: 827 ~ 834

14 Pritchett D W, Young S Y *et al*. Proteolytic activity in the digestive fluid of larvae of *Trichoplusia ni*. Insect Biochem. 1981, **11**: 523 ~ 526

15 Barrett A J, McDonald J K. Mammalian proteases, A glossary and bibliography, Vol. 1. Endoproteinases. Toronto: Academic Press, 1980

PARTIAL CHARACTERIZATION OF PROTEASE ACTIVITY IN THE MIDGUT OF *HELICOVERPA ARMIGERA* LARVAE

Wang Chenzhu Qin Junde

(*Institute of Zoology, Academia Sinica Beijing* 100080)

Abstract The activities of three serine proteases in the midgut of *Helicoverpa armigera* larvae were partially characterized. The enzymes were an active alkaline trypsin-like enzyme with maximal hydrolysis of benzoyl arginine p-nitroanilide at pH 10.50 or higher, a weak alkaline trypsin-like enzyme with maximal hydrolysis of tosyl-L-arginine methyl ester at pH 8.50 ~ 9.00, and a chymotrypsin-like enzyme with maximal hydrolysis of benzoyl-L-tyrosine ethyl ester at pH 8.50 ~ 9.00. Total proteolysis, measured by using azocasein, hada maximal activity at pH 10.50 or higher. Ca^{2+} had no activation effect on larval proteases, but Mg^{2+} activated the weak alkaline trypsin-like enzyme. The inhibition with phenyl methyl sulfonyl fluoride and tosyl-L-lysine chloromethyl ketone to the weak alkaline trypsin-like enzyme activity was greater than that to the active alkaline trypsin-like enzyme activity. The tosyl-L-phenylalinine chloromethyl ketone was not only the inhibitor of the chymotrypsin-like enzyme, but also the activator of the weak alkaline trypsin-like enzyme. Comparison between the insect protease and bovine counterpart protease revealed difference in inhibitor sensitivity. Ovomucoid trypsin inhibitor that inhibited bovine trypsin had no effect on insect trypsin-like enzymes. Soybean trypsin inhibitor had great inhibition on both insect and bovine proteases.

Key words *Helicoverpa armigera*, protease, activator, inhibitor